

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局(43) 国際公開日  
2004 年 9 月 30 日 (30.09.2004)

PCT

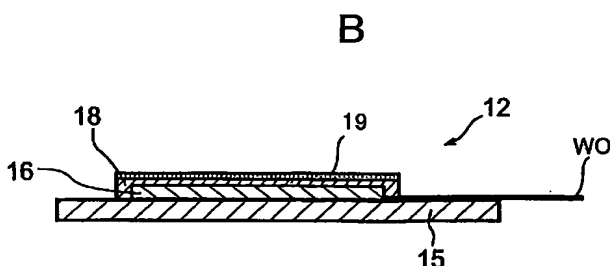
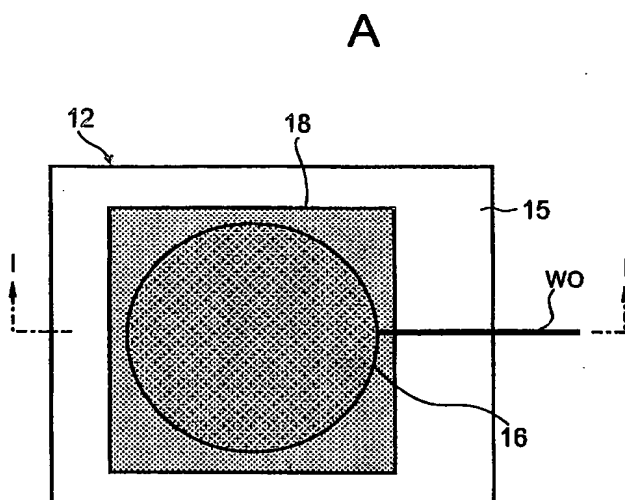
(10) 国際公開番号  
WO 2004/083841 A1

- (51) 国際特許分類: G01N 27/327 (72) 発明者; および  
(21) 国際出願番号: PCT/JP2004/003467 (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 久保 いづみ  
(22) 国際出願日: 2004 年 3 月 16 日 (16.03.2004) (KUBO, Izumi) [JP/JP]; 〒1928577 東京都八王子市丹  
(25) 国際出願の言語: 日本語 木町 1-2-36 創価大学工学部内 Tokyo (JP). 前原 信  
(26) 国際公開の言語: 日本語 義 (MAEHARA, Nobuyoshi) [JP/JP]; 〒1928577 東京都  
(30) 優先権データ: 特願2003-074543 2003 年 3 月 18 日 (18.03.2003) JP 八王子市丹木町 1-2-36 創価大学工学部内 Tokyo (JP).  
(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): タマ  
ティーエルオー株式会社 (TAMA-TLO, LTD.) [JP/JP];  
〒1920083 東京都八王子市旭町 9 番 1 号 八王子スク  
エアビル 1 1 階 Tokyo (JP). (74) 代理人: 佐藤 隆久 (SATO, Takahisa); 〒1110052 東  
京都台東区柳橋 2 丁目 4 番 2 号 創造国際特許事務  
所 Tokyo (JP).  
(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が  
可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR,  
BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,

[続葉有]

(54) Title: ELECTRODE AND SENSOR USING SAME

(54) 発明の名称: 電極およびそれを用いたセンサー



(57) Abstract: An electrode leading to improvement of measurement accuracy by using a novel self-organizing monomolecular membrane which suppresses the influence of an interference substance on measurement of an object and a sensor using such an electrode are disclosed. The sensor comprises a modified electrode (12) and a counter electrode. The modified electrode (12) is composed of a gold electrode (16) serving as an electrode base, a self-organizing monomolecular membrane (18) made of carboxyl alkanethiol expressed by chemical structural formula  $\text{HS}(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$  ( $n=5$  to 9) and covering the gold electrode (16), and an enzyme (19) immobilized on the self-organizing monomolecular membrane (18). When fructose is measured, FDH is used as the enzyme (19). When the self-organizing monomolecular membrane (18) is made of 7-carboxy-1-heptanethiol, the self-organizing monomolecular membrane (18) selectively passes  $\text{Co}(\text{phen})_3^{2+}$  to serve as a mediator.

(57) 要約: 本発明の目的は、測定対象物の計測における干渉物質の影響を抑制する新規な自己組織化単分子膜を用いることにより、計測精度を向上可能な電極、およびこの電極を用いたセンサーを提供することにある。センサーは、修飾電極 12 と、対向電極とを有する。修飾電極 12 は、電極基材としての金電極 16 と、金電極 16 を被覆する  $\text{HS}(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$  ( $n=5 \sim 9$ ) の化学構造式で示されるカルボキシルカンチオールからなる自己組織化単分子膜 18 と、自己組織化単分子膜 18 上に固定化された酵素 19 とを有する。フルクトースを計測

する場合には、酵素 19 として、FDH を用いる。7-carboxy-1-heptanethiol により作製した場合、自己組織化単分子膜 18 は、メディエータとしての  $\text{Co}(\text{phen})_3^{2+}$  を選択的に通過させる。



DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY,

CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

## 明 細 書

### 電極およびそれを用いたセンサー

#### 技術分野

本発明は、電気化学的反応により測定対象物を計測するセンサー、およびこのセンサーに用いられる電極に関する。

#### 背景技術

電気化学的反応を利用して試料中の測定対象物を計測する化学センサー、バイオセンサーが種々知られている。これらのセンサーの一種として、測定対象物と電極とを反応させるための物質を自己組織化単分子膜によって電極に固定したセンサーが知られている。

センサーが測定する試料中には、測定対象物以外の夾雑物として、測定対象物と電極との電気化学的反応に干渉する干渉物質が含まれている場合がある。そしてこの干渉物質が測定対象物の測定結果に影響を与えていることが指摘されている。測定結果に影響を与える干渉物質として、たとえば、アスコルビン酸や尿酸が知られている。

たとえば、フルクトース（果糖）の計測において試料中にアスコルビン酸が含まれていると、フルクトースの酸化反応に起因する電流とアスコルビン酸の酸化反応に起因する電流の両方が電極に流れるため、フルクトースの濃度を正確に計測することが困難となる。

ところで、生体試料中に比較的多量に存在する、アスコルビン酸や尿酸等の夾雑物質による電気化学的反応を防止するため、自己組織化単分子膜として10-carboxy-1-decanethiol を採用した技術が開示されている（篠原寛明，「電極界面分子集積膜の設計による生体重要物質の高選択センシング」，構造規制機能界面の

構築と電極反応 平成10年度成果報告書, 1999年, p. 145-146 参照)。

### 発明の開示

本発明の目的は、測定対象物の計測における干渉物質の影響を抑制する新規な自己組織化単分子膜を用いることにより、計測精度を向上可能な電極、およびこの電極を用いたセンサーを提供することにある。

上記の目的を達成するため、本発明の電極は、電極基材と、前記電極基材を被覆する、 $\text{HS}(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$  ( $n = 5 \sim 9$ ) の化学構造式で示される自己組織化単分子膜とを有する。

上記の目的を達成するため、本発明のセンサーは、測定対象物が溶解した試料溶液を収容する容器と、前記試料溶液中に浸漬される修飾電極および対向電極とを有し、前記修飾電極は、電極基材と、前記電極基材を被覆する、 $\text{HS}(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$  ( $n = 5 \sim 9$ ) の化学構造式で示される自己組織化単分子膜とを有する。

### 図面の簡単な説明

図1は、本実施形態に係るセンサーの概略構成図である。

図2Aは本実施形態に係る修飾電極の構成を示す平面図であり、図2Bは図2Aにおける断面I-Iから見た断面図である。

図3は、フルクトースセンサーの構成を示す図である。

図4は、自己組織化単分子膜の選択性の確認実験において用いる修飾電極の断面図である。

図5は、自己組織化単分子膜の選択性の確認実験において得られた、アスコルビン酸に対するサイクリックボルタモグラムである。

図6は、自己組織化単分子膜の選択性の確認実験において得られた、 $\text{Co}(\text{phen})$

)  $\text{Fe}^{2+}$ に対するサイクリックボルタモグラムである。

図 7 は、グルコースセンサーの構成を示す図である。

図 8 は、 $\text{Co}(\text{phen})\text{Fe}^{2+}$ をメディエータとして用いたグルコースセンサーによる、グルコースの濃度測定結果を示す図である。

図 9 は、カテコールアミンセンサーの構成を示す図である。

図 10 は、カテコールアミンセンサーによって、ドーパミンとアスコルビン酸の反応を測定した測定結果を示す図である。

図 11 は、カテコールアミンセンサーによるドーパミンの検量線を示す図である。

図 12 は、自己組織化単分子膜を形成する脂質のアルキル鎖長とドーパミン選択性の関係を示す図である。

図 13 は、本発明の実施の形態の変形例に係るセンサーモジュールの平面図である。

### 発明を実施するための最良の形態

以下、添付図面を参照しながら本発明の実施の形態について述べる。

#### (装置構成)

図 1 は、本発明に係るセンサーの一実施の形態の概略構成図である。

図 1 に示すセンサー 10 は、濃度が測定される測定対象物が溶解している試料溶液 5 を入れる容器 (バイアル) 3 と、白金 (Pt) 線からなる対向電極 11 と、修飾電極 (作用電極) 12 と、銀/塩化銀 ( $\text{Ag}/\text{AgCl}$ ) 電極からなる参照電極 13 と、電位印加手段としてのポテンショ・ガルバノスタット (potentio galvanostat) 装置 7 と、演算処理手段としてのコンピュータ 9 とを有する。

対向電極 11、修飾電極 12、および参照電極 13 は、たとえば、図示しない上蓋に固定されて、容器 3 内の試料溶液 5 に浸漬される。対向電極 11 としては、白金線以外にも、たとえば銀/塩化銀 ( $\text{Ag}/\text{AgCl}$ ) 電極を用いることができる。

。また、参照電極 13 としては、銀／塩化銀電極以外に、たとえば飽和カロメル電極を用いることもできる。

ポテンシヨ・ガルバノスタット装置 7 は、電線 W0, W1, W2 を介して修飾電極 12 に接続され、電線 W3 を介して対向電極 11 と接続され、電線 W4 を介して参照電極 13 に接続されている。

ポテンシヨ・ガルバノスタット装置 7 は、修飾電極 12 の電位をある範囲内に制御するポテンシヨスタットとしての機能と、修飾電極 12 と対向電極 11 との間に流れる電流を検出するガルバノスタットとしての機能を併せ持つ装置であり、一般的に、電気化学測定に用いられている。検出された電流値は、コンピュータ 9 に送られる。

ポテンシヨ・ガルバノスタット装置 7 は、修飾電極 12 に所定の電位を印加して電極反応を修飾電極 12 で起こさせる。修飾電極 12 において、電子が溶液中の物質に与えられる反応が起きた場合、その反対の反応（溶液中の物質から電子を渡す反応）を別の電極である対向電極 11 で起こさせることにより回路に電流が流れるという原理で電気化学的反応を測定する。

修飾電極 12 に所定の電位を印加する際に、本実施の形態においては、ポテンシヨ・ガルバノスタット装置 7 は修飾電極 12 および対向電極 11 とは別の参照電極 13 に所定の電位を与えておく。そして、参照電極 13 への印加電位を基準として、修飾電極 12 に所定の電位を印加する。

コンピュータ 9 は、たとえばメモリに事前に記憶されている測定対象物の濃度と電流との関係式を意味する検量線に基づいて、容器 3 内の試料溶液 5 の測定電流値から測定対象物の濃度を決定する。コンピュータ 9 は、算出した測定対象物の濃度を、たとえばその表示器に表示出力する。

図 2 は、本実施の形態に係る修飾電極 12 の一実施形態の構成図である。図 2 A は修飾電極 12 の平面図であり、図 2 B は図 2 A における断面 I - I から見た断面図である。

修飾電極 12 は、たとえば、ガラスやプラスチック製の基板 15 に固着された金電極（電極基材）16 と、金電極 16 の表面を覆う自己組織化単分子膜 18 と、自己組織化単分子膜 18 上に固定化した酵素 19 とを有する。金電極 16 には、電位の印加および電流の測定のための電線 W0 が接続されている。

測定対象物としては、例えば、フルクトース、グルコース、カテコールアミン、キノン、セロトニン、疎水性のアミノ酸等の生体物質および化学物質が挙げられる。

自己組織化単分子膜 18 は、 $\text{HS}(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$  ( $n=5\sim 9$ ) の化学構造式で示されるカルボキシアルカンチオールにより構成される。例えば、 $n=5$  の 5-carboxy-1-pentanetiol、 $n=6$  の 6-carboxy-1-hexanetiol、 $n=7$  の 7-carboxy-1-heptanetiol、 $n=8$  の 8-carboxy-1-octanetiol、 $n=9$  の 9-carboxy-1-nonanetiol の何れかにより構成される。

チオール化合物は金表面と反応して金-システアミン (Au-S) 結合を形成する。なかでも、アルカンチオール化合物を用いると、Au-S 結合に加えてアルキル鎖同士のファンデルワールス (Van der Waals) 相互作用も働くため、高い配向性を有する欠陥のない単分子膜を作製可能である。このような単分子膜を自己組織化単分子膜という。自己組織化単分子膜 18 による金電極 16 の修飾は、チオール化合物の溶液中に金電極 16 を浸漬するだけで可能である。

本実施形態に係る自己組織化単分子膜 18 は、そのカルボキシル基によりアスコルビン酸や尿酸等の水溶性で電気化学的に活性な干渉物質を反発させて退け、金電極 16 への到達を阻む。

酵素 19 は、例えば測定対象物に応じて選定される。測定対象物がフルクトースであれば、酵素 19 として、例えば、フルクトース・デヒドロゲナーゼ (FDH: fructose dehydrogenase) を用いる。測定対象物がグルコースであれば、酵素 19 として、グルコースの酸化酵素であるグルコースオキシダーゼ (GOD: glucose oxidase) を用いる。

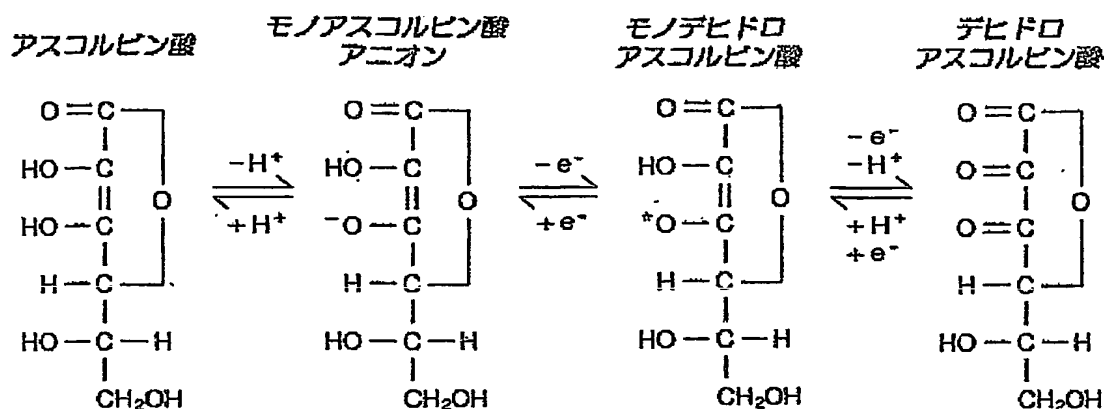
本実施の形態においては、酵素 1 9 による測定対象物の酸化反応を、メディエータ（調停手段または電気化学活性種）を用いて仲介することによって金電極 1 6 における電気信号に変換する。この電気信号を検出することによって、測定対象物の存在を検知することができる。

メディエータとしては、疎水性のものが好ましい。このようなメディエータとし、たとえば、コバルトフェナントロリン錯体（フェナントロリンコバルト錯体） $[\text{Co}(\text{phen})_3^{2+}]$ （phenanthroline cobalt (II) complex）や、フェロセン錯体を用いる。 $\text{Co}(\text{phen})_3^{2+}$ は、調整が容易であり、可逆的な酸化還元が可能であり、酸化還元電位が比較的低電位でフェナントロリンを配位子とする他の金属錯体の中で最も低いという利点を有する。 $\text{Co}(\text{phen})_3^{2+}$ は、たとえば、溶液として試料溶液 5 に混入しておく。

現時点で最も優れているメディエータは、コバルトフェナントロリン錯体である。コバルトフェナントロリン錯体は、酸化電位が約 200 mV とフェロセンの酸化電位と比較して低い。このように、低い電位で反応させられることから、アスコルビン酸等の物質の影響を受けにくいからである。

上記の化学構造式をもつ自己組織化単分子膜 1 8 は、金電極 1 6 における測定対象物の計測のための電気化学的反応を発生させる物質のみを通過させる。すなわち、 $\text{Co}(\text{phen})_3^{2+}$ 等のメディエータは通過させて、試料溶液 5 中のアスコルビン酸や尿酸などの夾雑物は通過させずに金電極 1 6 から退けさせる。アスコルビン酸や尿酸は、測定対象物が含まれている野菜や果実、血液や尿中に比較的多量に含有されており、金電極 1 6 において酸化反応を生じる。下記式は、アスコルビン酸の酸化還元反応を示す式である。





アスコルビン酸は、モノアスコルビン酸アニオン、モノデヒドロアスコルビン酸を経る酸化反応において水素2原子を失い、デヒドロアスコルビン酸となる。その際に、モノデヒドロアスコルビン酸に係る反応において電流が流れる。

このように、金電極16近傍にアスコルビン酸が存在すると、金電極16に電極反応電位が印加された場合にアスコルビン酸自体が酸化して電流が流れる。このため、試料溶液5中にアスコルビン酸が含まれていると、測定対象物と金電極16における電極反応に干渉する干渉物質として振る舞い、センサー10による測定対象物の濃度の測定精度を低下させる。尿酸についても同様にそれ自体が酸化して干渉物質として振る舞う。

しかしながら、本実施の形態においては自己組織化単分子膜18が、アスコルビン酸や尿酸などの夾雑物を退けて金電極16への到達を阻み、測定対象物の計測のための電気化学的反応を発生させる物質を選択的に通過させる。

以上のような構成のセンサー10を用いて試料溶液5中の測定対象物の濃度を測定する場合には、ポテンシヨ・ガルバノスタット装置7が参照電極13に電線W4を介して所定の電位を正確に印加する。

さらに、ポテンシヨ・ガルバノスタット装置7は、参照電極13への印加電位

を基準として、修飾電極 1 2 に接続されている電線 W 1 および W 2 を介して、修飾電極 1 2 に所定の電位を印加する。修飾電極 1 2 に印加する電位は、たとえば、 $\text{Co}(\text{phen})_3^{2+}$  と金電極 1 6 との後述する電極反応が発生する電位である。

電気化学的反應が生じないため値が変動することの無い参照電極 1 3 の電位を基準として修飾電極 1 2 に電位を印加することにより、修飾電極 1 2 の電位を保ち電極反應の進行に伴う電位の変動を無くすることができる。

上述した本発明の一実施の形態に係るセンサー 1 0 においては、修飾電極 1 2 の金電極 1 6 を、自己組織化単分子膜 1 8 によって修飾し、さらに酵素 1 9 を固定している。このように、測定のための電気化学的反應以外の反應を発生させる干渉物質の金電極 1 6 への到達を防ぐことができる。その結果、修飾電極 1 2 の選択性が向上し、センサー 1 0 による測定対象物の測定精度が向上する。

自己組織化単分子膜 1 8 はチオール化合物の溶液中に金電極を浸漬するだけで作製できるため、修飾電極 1 2 およびセンサー 1 0 を低価格で簡便に製造することが可能になる。

また、酸化還元滴定法やガスクロマトグラフィー法のように装置や測定方法が複雑ではなく、簡便に測定対象物を測定することができる。また、ブドウ糖に反応することがないため、ブドウ糖の影響を取り除くための労力を必要とせず、簡便かつ高精度にフルクトース等の測定対象物の濃度を測定することができる。

さらに、本実施の形態においては、修飾電極 1 2、対向電極 1 1、および参照電極 1 3 の三つの電極を用い、参照電極 1 3 に印加した電位を基準として修飾電極 1 2 に電極反應電位を印加する三電極系によって測定を行なう。このため、電極反應に伴う修飾電極 1 2 の電位の変動を抑制し、高精度な測定が可能となる。

#### (フルクトースセンサの実施例)

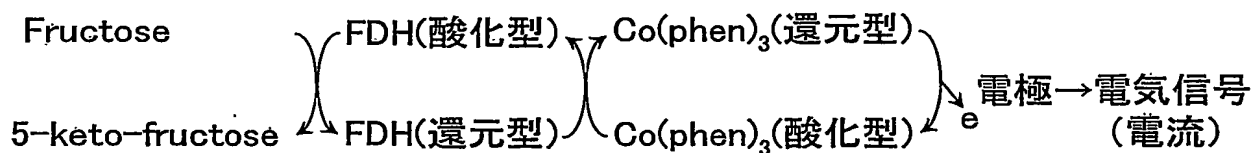
まず、測定対象物としてフルクトースの濃度を測定するフルクトースセンサの実施例について述べる。本実施例においては、図 3 に示すように、自己組織化単

分子膜 18 を利用して、酵素 19 として F D H を金電極 16 に固定化する。

本実施例においては、たとえば、7-carboxy-1-heptanthiol (7 C) により自己組織化単分子膜 18 を形成する。7 C は、図 3 に示すように、Au-S 結合に加えてアルキル鎖 20 同士のファンデルワールス (Van der Waals) 相互作用も働くため、高い配向性を有する欠陥のない単分子膜を作製可能である。本実施例においては、F D H は 7 C による自己組織化単分子膜 18 のアルキル鎖 20 に結合する。これにより、F D H は金電極 16 に固定される。

F D H は、3 つのサブユニットからなる分子量 140,000 Da の膜結合の pyrrroloquinoline quinone (P Q Q) 依存オキシレダクターゼである。F D H は P Q Q と強く結合している。F D H は D-フルクトースを 5-ケト (keto) -フルクトース (fructose) に酸化し、P Q Q は P Q Q H<sub>2</sub> に還元される。

本実施例では、F D H によるフルクトースの酸化反応を、Co (phen)<sub>3</sub><sup>2+</sup> からなるメディエータを用いて仲介することによって金電極 16 における電気信号に変換する。フルクトースの検出原理を以下に示す。



試料溶液 5 中のフルクトースを F D H が酸化することによって、還元型のコバルトフェナントロリン錯体が生じる。この還元型のコバルトフェナントロリン錯体が自己組織化単分子膜 18 を通過して金電極 16 表面において酸化することによって、金電極 16 に電気信号が発生する。

また、容器 3 の試料溶液 5 中にアスコルビン酸や尿酸等の夾雑物が存在したとしても、夾雑物は自己組織化単分子膜 1 8 によって金電極 1 6 への到達を阻まれる。

上記したように、7 C からなる自己組織化単分子膜 1 8 は、そのカルボキシル基によりアスコルビン酸や尿酸等の水溶性で電気化学的に活性な干渉物質を反発させて退け、金電極 1 6 への到達を阻む。

以下では、7 C を用いて形成した自己組織化単分子膜 1 8 が、アスコルビン酸を退かせるという選択性を有することを確認するための実験の一例について述べる。

アスコルビン酸は、上述のようにそれ自体が金電極 1 6 の表面において酸化することによって金電極 1 6 における電極反応に干渉する。このため、フルクトースの測定のための電気化学的反應におけるアスコルビン酸の影響を調べるにあたりフルクトースを酸化させるための F D H は必要ない。したがって、7 C により形成した自己組織化単分子膜 1 8 のみを修飾した修飾電極を用いてアスコルビン酸による電気化学反応を計測する。

図 4 は、本実験において用いる修飾電極の断面図である。図 4 に示す修飾電極 3 0 は、図 2 B に示す修飾電極 1 2 から酵素 1 9 を取り除いたものである。このため、同一構成要素には同一符号を付し、詳細な記述は省略する。

図 4 に示す修飾電極 3 0 においても、修飾電極 1 2 と同様に、Au-S 結合により金電極 1 6 に 7 C を直接修飾して自己組織化単分子膜 1 8 を形成している。

図 1 に示す三電極系のセンサー 1 0 において修飾電極 1 2 の代わりに上記の修飾電極 3 0 を用いて、印加電位と電極反応との関係調べるサイクリックボルタンメトリー (Cyclic Voltammetry : CV) 測定をアスコルビン酸に対して行なった。

容器 3 には、試料溶液 5 として 0.6 mM ( $M = \text{mol/l}$ ) のアスコルビン酸溶液を入れた。試料溶液 5 中には、窒素ガスを継続的に注入した。

以上の条件のもとで、修飾電極 30 に印加する電位を、掃引速度 10 mV/sec で増加させた後に減少させて掃引し、修飾電極 30 と対向電極 11 との間に流れた電流を検出することによりサイクリックボルタモグラムを得た。

比較のために、FDH、Glutamate、および (N-5-Amino-1-Carboxypentyl) imino diacetic acid (AB-NTA) によって金電極 16 を修飾した修飾電極をそれぞれ作製し、7 C を修飾した修飾を用いた場合と同様の CV 測定を行なった。

FDH 修飾電極は、金電極 16 に 0.5 mg/ml Cystamine、5 % Glutaraldehyde を修飾し、アルデヒド基を導入した後に、0.5 mg/ml FDH を固定して作製した。Glutamate 修飾電極および AB-NTA 修飾電極は、上述の FDH 修飾と同様に Glutaraldehyde を固定した後に、Glutamate および AB-NTA のみをそれぞれ修飾して作製した。なお、Glutamate 分子はアルキル鎖を持たないが、カルボキシル基を 2 個有する。また、AB-NTA は 1 本のアルキル鎖につき 3 個のカルボキシル基を有する。

上記 4 つの修飾電極のそれぞれに対するサイクリックボルタモグラムを図 5 に示す。

図 5 において、横軸は修飾電極に印加した電位 [mV] であり、縦軸はポテンシヨ・ガルバノスタット装置 7 が検出した電流 [A] である。

また、△印が AB-NTA 修飾電極を用いた場合の結果であり、□印が Glutamate 修飾電極を用いた場合の結果である。×印は FDH 修飾電極を用いた場合の結果を示しており、○印は 7 C 修飾電極を用いた場合の結果を示している。

電位を増加させた後に減少させて掃引するため、1 つの電位について 2 つの電流の値がプロットされている。

図 5 において、電流の値が大きいほど、金電極 16 においてアスコルビン酸の酸化反応が起きていることを表わしている。

図 5 に示すように、FDH 修飾電極の結果を基準としてみると、Glutamate 修飾電極および AB-NTA 修飾電極を用いた場合には、ピーク電流はほとんど変わらない。

いか、むしろ大きくなっている。この結果から、GlutamateおよびAB-NTAによる修飾では、金電極 16 におけるアスコルビン酸の酸化反応の防止において良い効果を得ることができないことが分かる。

一方、7 C 修飾電極を用いた場合には、図 5 から明らかなようにアスコルビン酸の酸化反応がほとんど見られなくなった。このことから、7 C 修飾電極は、アスコルビン酸の酸化反応の防止のために非常に効果的であると言える。

前述の実験から、7 C 修飾電極はアスコルビン酸の酸化反応の防止に効果的であることは分かった。しかし、フルクトースセンサーとして用いるためには、7 C 修飾電極がメディエータに対して電極反応を発生することが必要である。これを確かめるために、メディエータとして 1 mM の  $\text{Co}(\text{phen})_3^{2+}$  溶液を容器 3 に入れ、7 C 修飾電極を用いたセンサー 10 によって CV 測定を行なった。その結果を図 6 に示す。

図 6 に示すサイクリックボルタモグラムの横軸および縦軸は、図 5 と同様に修飾電極に印加した電位 [mV] およびポテンシオ・ガルバノスタット装置 7 が検出した電流 [A] をそれぞれ表わしている。

図 6 に示すように、約 200 [mV] において酸化電流のピークが見られ、約 100 [mV] において還元電流のピークが見られた。以上のことから、7 C 修飾電極によって  $\text{Co}(\text{phen})_3^{2+}$  の酸化還元反応が生じることが確認できた。

上述の  $\text{Co}(\text{phen})_3^{2+}$  に対する CV 測定は、7 C の濃度を 0.05 ~ 0.2 mg/ml の範囲において変化させて自己組織化単分子膜 18 を形成した 7 C 修飾電極をそれぞれ用いて複数回行なった。その結果、7 C 濃度が 0.15 mg/ml の時に、 $\text{Co}(\text{phen})_3^{2+}$  の酸化電流ピーク値が、それと同じ電圧でのアスコルビン酸電流値に比べ約 1257 倍と比較的高く、 $\text{Co}(\text{phen})_3^{2+}$  の酸化反応に対する、アスコルビン酸の干渉が最小であった。

この結果から、7 C を用いた自己組織化単分子膜 18 は  $\text{Co}(\text{phen})_3^{2+}$  を選択的に通過させ、7 C 修飾電極はフルクトース測定のための選択性を有すると言える。

る。

7 C 修飾電極が実際にフルクトースセンサーとして機能するかどうかの確認実験を行なった。修飾濃度 0.15 mg/ml の電極で、 $\text{Co}(\text{phen})_3^{2+}$  液中に FDH 濃度 3 mg/ml になるように FDH を溶かして CV 測定を行なった後に、フルクトースを滴下して 1 mM となるようにし、CV 測定を行なった。

その結果、フルクトースを加えなかった時に比べ、加えた時は酸化電流値が約 1.23 倍に増大した。すなわち、FDH によるフルクトースの酸化反応が、 $\text{Co}(\text{phen})_3^{2+}$  より金電極 16 での酸化電流として計測された。

以上により、7 C 修飾電極を有するセンサーがフルクトースセンサーとして実用的に使用可能であることが言える。7 C 修飾電極を有するフルクトースセンサーは、アスコルビン酸の干渉を抑制することができるため、フルクトースに対する選択性が高く、測定精度が従来よりも高い。

#### (グルコースセンサーの実施例)

図 7 は、グルコースセンサーの構成を示す図である。7 C からなる自己組織化単分子膜 18 上に酵素 19 としてグルコースの酸化酵素であるグルコースオキシダーゼ (GOD: glucose oxidase) を固定化することにより、グルコースセンサーを作製した。

GOD の固定化は、カルボキシル基を利用したカルボジイミド法で直接 7 C に結合させても、7 C と結合はさせずに GOD 単独の層を設けてもよい。グルコースの測定に際しては、7 C からなる自己組織化単分子膜 18 を通して、GOD との間で電荷移動をさせうるものであればよく、 $\text{Co}(\text{phen})_3^{2+}$ 、 $\text{Fe}(\text{phen})_3^{2+}$  などのメディエータが使用できるが、これらに制限されるものではない。

図 8 に、 $\text{Co}(\text{phen})_3^{2+}$  をメディエータとして用いて測定した場合の測定結果を示す。図 8 に示すように、検出される電流は、グルコース濃度に依存しており、グルコースの選択的な計測に利用できることがわかる。なお、7 C 修飾電極が金電極 16 におけるアスコルビン酸の酸化反応を防止する点については図 5 に示

す実験例で確認済みであり、7 C 修飾電極が $\text{Co}(\text{phen})_3^{2+}$ からなるメディエータに対して電極反応を発生させる点については図 6 で確認済みである。

以上により、7 C 修飾電極を有するセンサーがグルコースセンサーとして実用的に使用可能であることが言える。7 C 修飾電極を有するグルコースセンサーは、アスコルビン酸の干渉を抑制することができるため、グルコースに対する選択性が高く、測定精度が従来よりも高い。

#### (カテコールアミンセンサーの実施例)

自己組織化単分子膜 1 8 で修飾した修飾電極を、カテコールアミンのひとつであり、神経伝達物質であるドーパミンの計測に利用した実施例について述べる。

図 9 は、カテコールアミンセンサーの構成を示す図である。

金電極 1 6 の表面を、0.15 mg/ml の 7 C に 1 時間浸漬し、図 9 に示すような修飾電極を作製した。そして、当該修飾電極を用いて、ポテンショ・ガルバノスタット装置 7 により、所定の電位を印加して電極反応を起こさせた。

当該修飾電極により、ドーパミン (DP) とアスコルビン酸 (ASC) の反応を測定した CV 測定の結果を図 10 に示す。図 10 に示すサイクリックボルタモグラムの横軸は、修飾電極に印加した電圧 [mV] であり、縦軸はポテンショ・ガルバノスタット装置 7 が検出した電流 [A] である。

図 10 からわかるように、ドーパミンでは未修飾の電極と変わらない反応が見られるのに対して、アスコルビン酸では反応がほとんどみられない。図 11 に、自己組織化単分子膜により修飾した修飾電極によるドーパミンの検量線を示す。図 11 に示すように、ドーパミンの電流はドーパミン濃度に依存しており、ドーパミンの選択的な計測に利用できることがわかる。

以上により、7 C 修飾電極を有するセンサーがドーパミンを含むカテコールアミンセンサーとして実用的に使用可能であることが言える。7 C 修飾電極を有するカテコールアミンセンサーは、アスコルビン酸の干渉を抑制することができる



ため、カテコールアミンに対する選択性が高く、測定精度が従来よりも高い。

(HS(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>COOH (n = 5 ~ 9) により構成したグルコースセンサの実施例)

本実施例では、金電極 16 上に、アルキル鎖長の異なる 5-carboxy-1-pentanethiol (5 C) と、7-carboxy-1-heptanethiol (7 C) と、10-carboxy-1-decanethiol (10 C) により自己組織化単分子膜 18 を形成し、それぞれの膜での、アスコルビン酸のピーク電流に対するドーパミンの電流の比 (ドーパミン / アスコルビン酸) を比較した。

図 12 は、上記の測定により得られた、自己組織化単分子膜を形成する脂質のアルキル鎖長とドーパミン選択性の比較を示す図である。

図 12 に示すように、ドーパミンに対する選択性は、7 C が最も優れているとわかる。今回の測定では 7 C には劣るが、5 C もドーパミンに対する選択性を有していることがわかる。なお、図 12 に示す結果から、アルキル鎖が 5 C と 7 C の間の 6-carboxy-1-hexanethiol (6 C)、7 C と 10 C の間の、8-carboxy-1-octanethiol (8 C) および 9-carboxy-1-nonanethiol (9 C) にも、ドーパミンに対する選択性があることが容易に予想される。

また、今回の実施例では、7 C が最も優れているとの知見が得られたが、測定対象物質が異なれば 5 C、あるいは 6 C, 8 C, 9 C も 7 C 同様に測定対象物質に対する優れた選択性があるといえる。

(装置構成の変形例)

図 13 は、本発明の実施の形態の変形例に係るセンサーモジュールの平面図である。

図 13 に示すセンサーモジュール 100 は、修飾電極 120 と、対向電極 (CE) 110 を、ガラスやプラスチック等の基板 150 に対向させて一体的に設置したものである。

修飾電極 120 は、図 2 に示す修飾電極 12 と同様に、金電極の表面に自己組

組織化単分子膜を形成して酵素を固定したものである。修飾電極 120 は電線 W0 を介して、対向電極 110 は電線 W3 を介して、それぞれポテンショ・ガルバノスタット装置 7 に接続される。

以上の構成により、図 1 に示す修飾電極 12 と対向電極 11 とをモジュール化したセンサーが得られる。本変形形態によれば、電極をモジュール化することにより、小型で取り扱いの簡便なセンサーを作製することができる。

以上、本発明の実施の形態について述べたが、本発明は上記の実施の形態に限定されない。

たとえば、本実施形態に係る自己組織化単分子膜 18 は、アスコルビン酸だけでなく、尿酸等の水溶性で電気化学的に活性な他の物質も退けて電極基材に近づけないようにすることができる。

本発明のセンサーは、実施の形態において述べたフルクトースセンサー、グルコースセンサー、カテコールアミンセンサーだけでなく、種々のバイオセンサーや化学センサーに適用可能である。

自己組織化単分子膜 18 が直接的に通過させるような測定対象物であれば、酵素 19 やメディエータ等の他の構成要素を用いる必要はない。

さらに、三電極系ほどの測定精度は得られない可能性はあるが、参照電極 13 を除いた二電極系によってセンサーを構成してもよい。二電極系にすることにより、センサーのさらなる小型化、低価格化が可能になる。

なお、センサーに用いる対向電極には、用途に応じて白金メッシュ、白金板等の種々の形態の電極を用いることができる。また、自己組織化単分子膜により修飾する電極基材についても、金以外の他の金属を用いることが可能であり、板状、線状等の様々な形状にすることが可能である。ただし、センサー用の電極基材としては、金が最も優れている。

以上のように、本発明によれば、自己組織化単分子膜を用いて測定対象物の計測における干渉物質の影響を抑制し、計測精度を向上可能な電極、およびこの電

極を用いたセンサーを提供することができる。

#### 産業上の利用可能性

本発明に係る電極およびそれを用いたセンサーは、測定対象物に応じて、食品工学、臨床学、工学、化学等の種々の分野に適用することができる。

## 請求の範囲

1. 電極基材と、

前記電極基材を被覆する、 $\text{HS}(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$  ( $n = 5 \sim 9$ ) の化学構造式で示される自己組織化単分子膜と  
を有する電極。

2. 前記自己組織化単分子膜上に、測定対象物を酸化還元反応させる酵素が固定化された

請求項 1 に記載の電極。

3. 測定対象物が溶解した試料溶液を収容する容器と、

前記試料溶液中に浸漬される修飾電極および対向電極とを有し、  
前記修飾電極は、  
電極基材と、

前記電極基材を被覆する、 $\text{HS}(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$  ( $n = 5 \sim 9$ ) の化学構造式で示される自己組織化単分子膜と  
を有するセンサー。

4. 前記試料溶液中に、前記測定対象物の酸化還元反応に応じて、前記電極基材との間で電荷の授受を行うメディエータが添加された

請求項 3 に記載のセンサー。

5. 前記試料溶液中に、疎水性の前記メディエータが添加された

請求項 4 に記載のセンサー。

6. 前記自己組織化単分子膜上に、前記測定対象物を酸化還元反応させる酵素が固定化された

請求項 3 ～ 5 のいずれかに記載のセンサー。

7. 前記修飾電極に電極反応電位を印加する電位印加手段と、

前記修飾電極と前記対向電極との間に流れる電流に応じて前記測定対象物の

濃度を算出する演算手段と

をさらに有する請求項 3 に記載のセンサー。

8. 参照電極をさらに有し、

前記電位印加手段は、前記参照電極の電位に対して所定の電位を前記修飾電極に印加する

請求項 7 に記載のセンサー。

FIG. 1

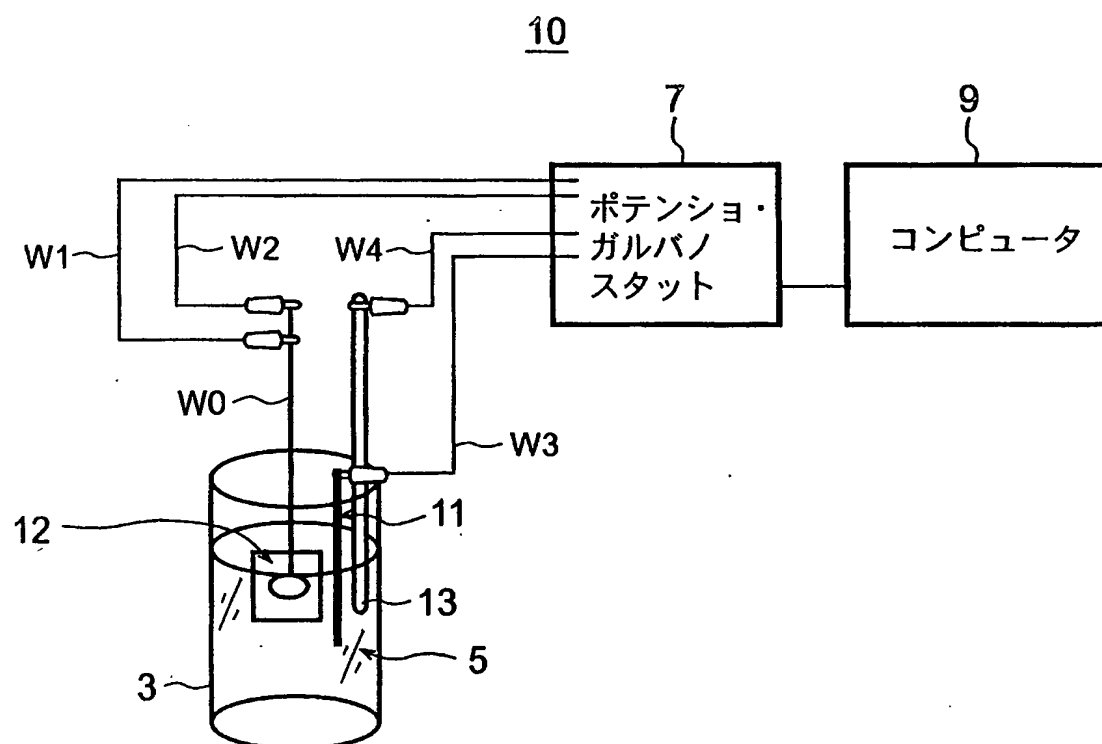


FIG. 2A

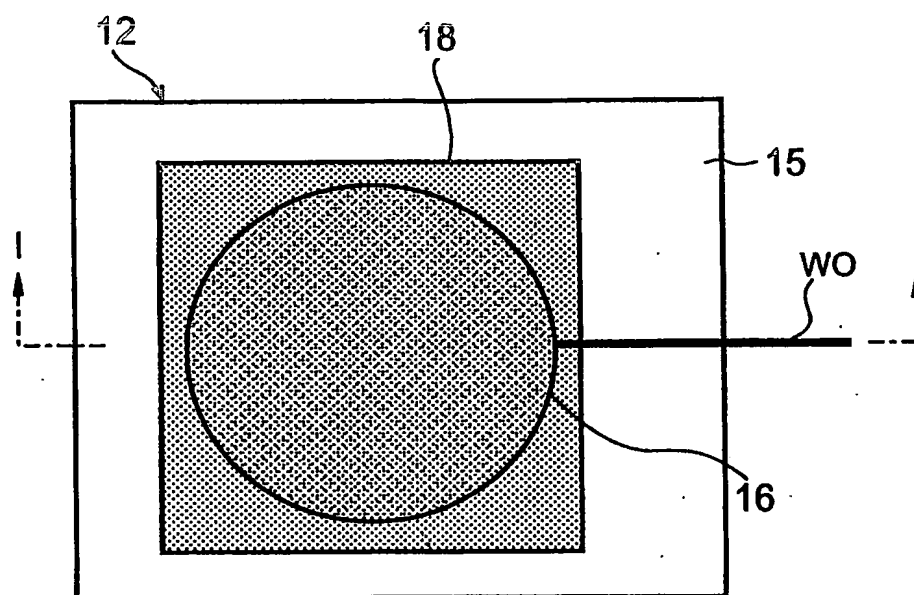


FIG. 2B

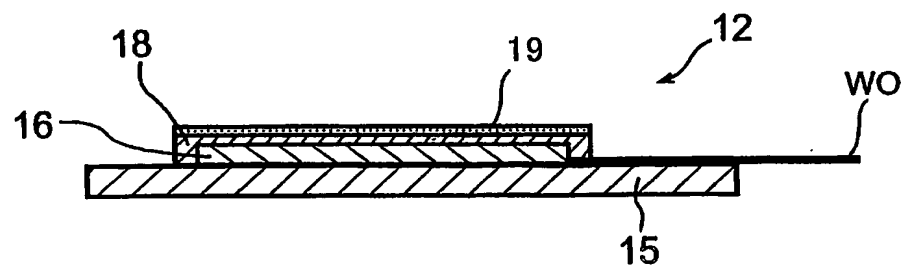


FIG. 3

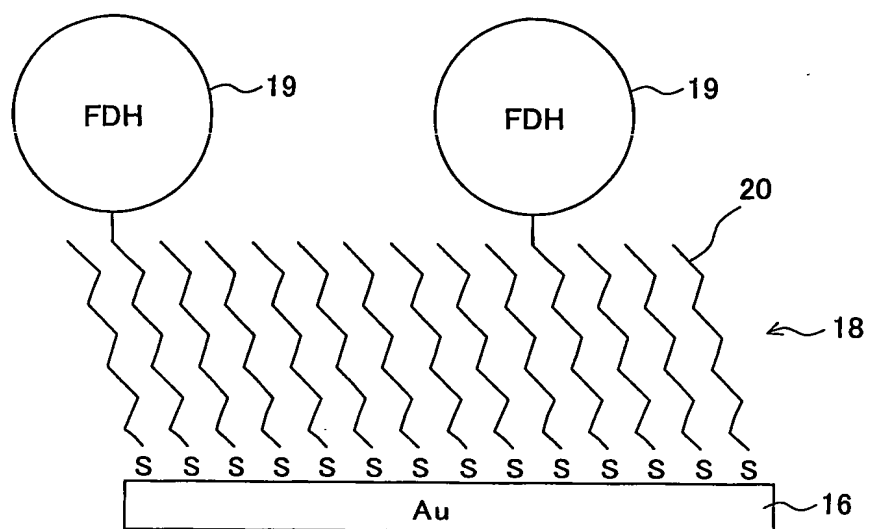


FIG. 4

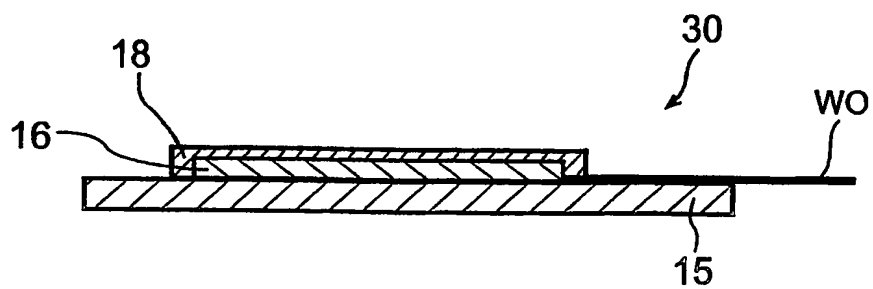




FIG. 5

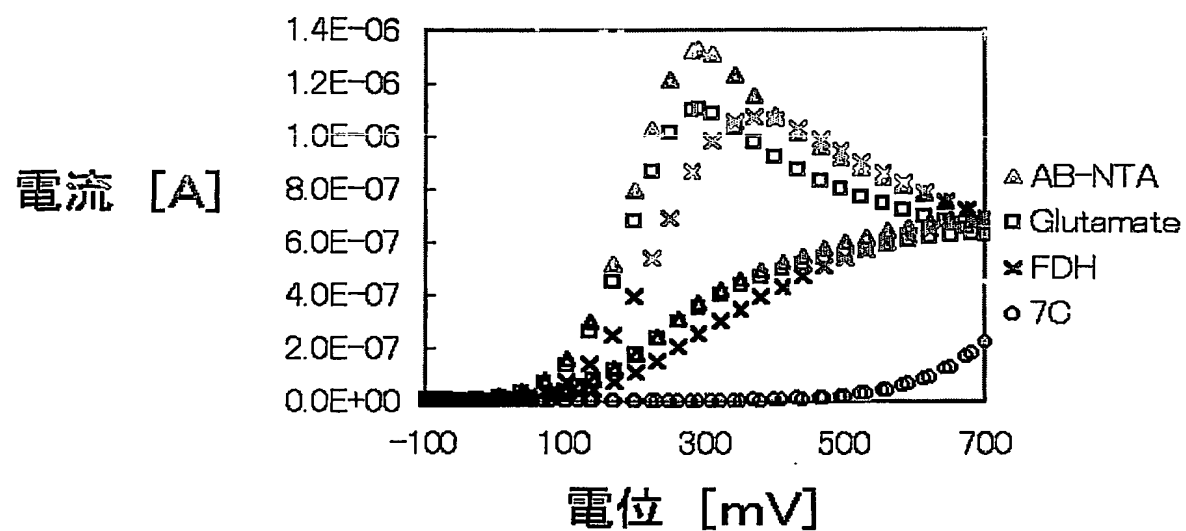


FIG. 6

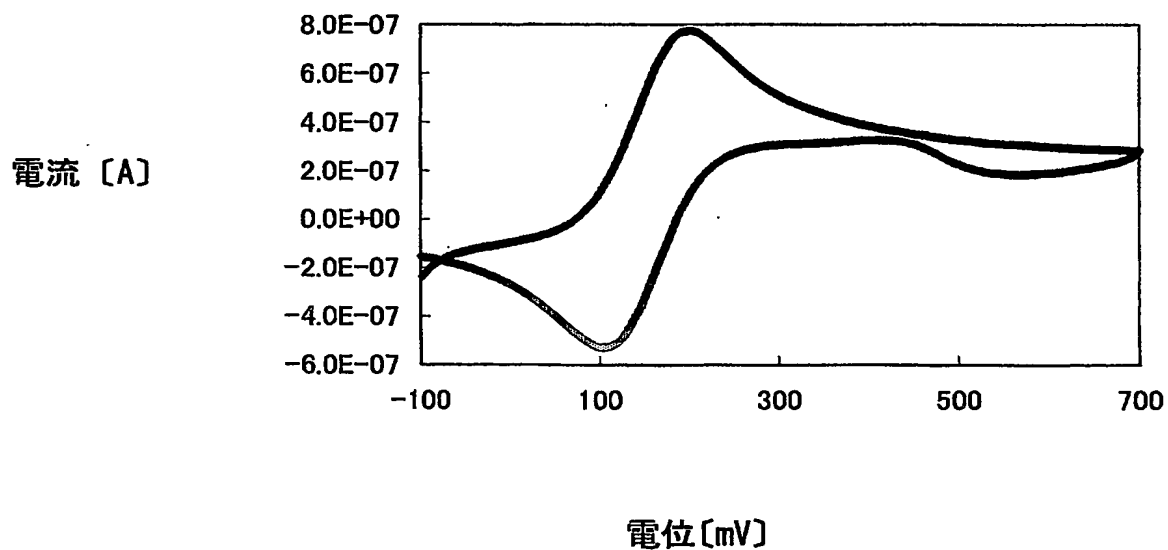


FIG. 7

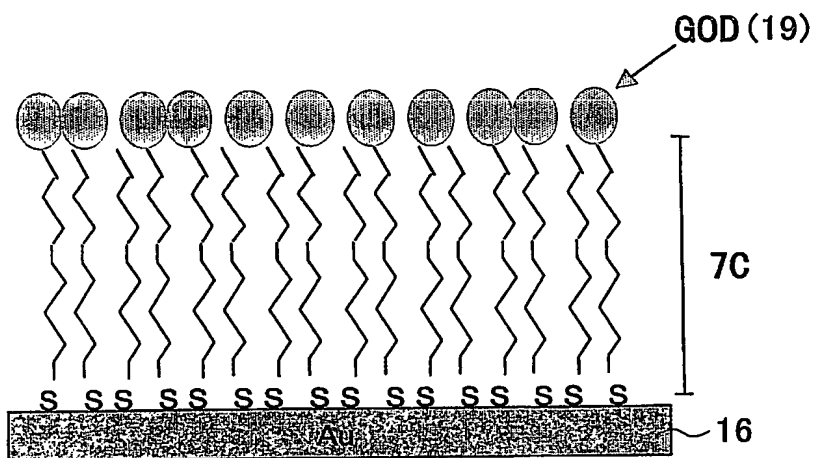


FIG. 8

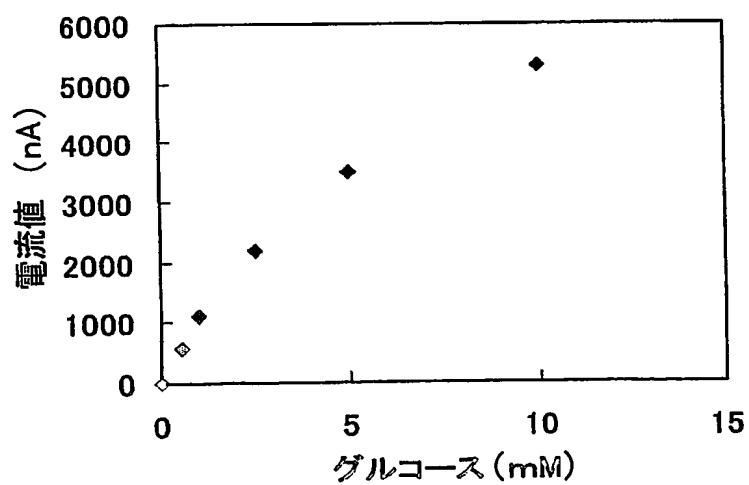


FIG. 9

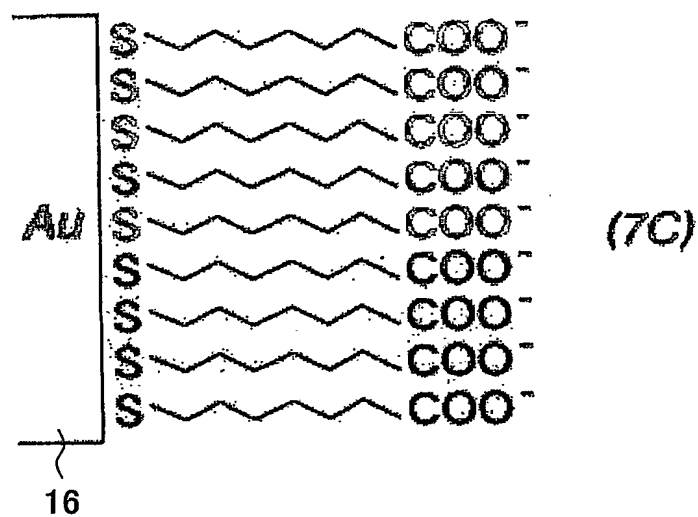


FIG. 10

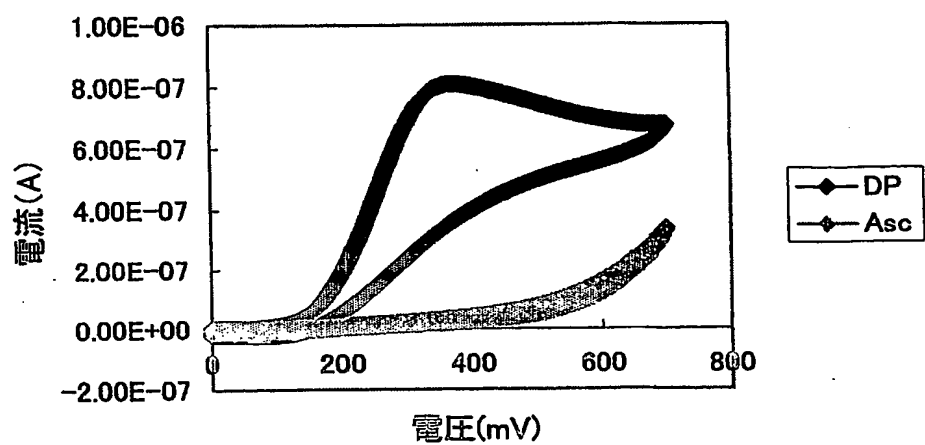


FIG. 11

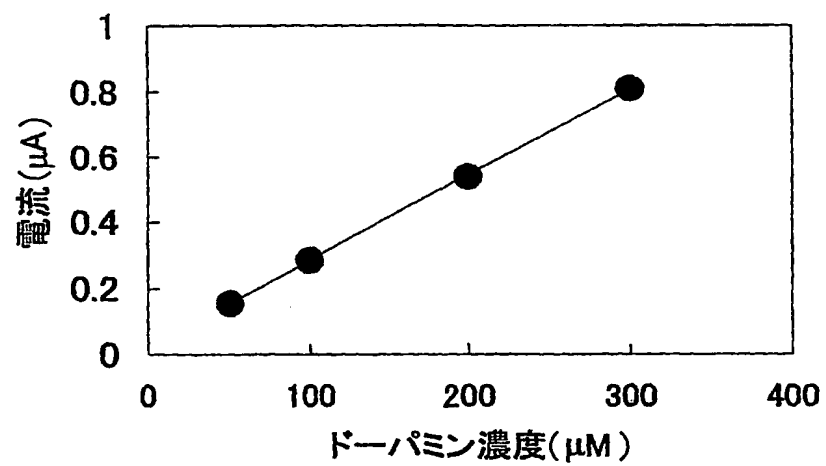


FIG. 12

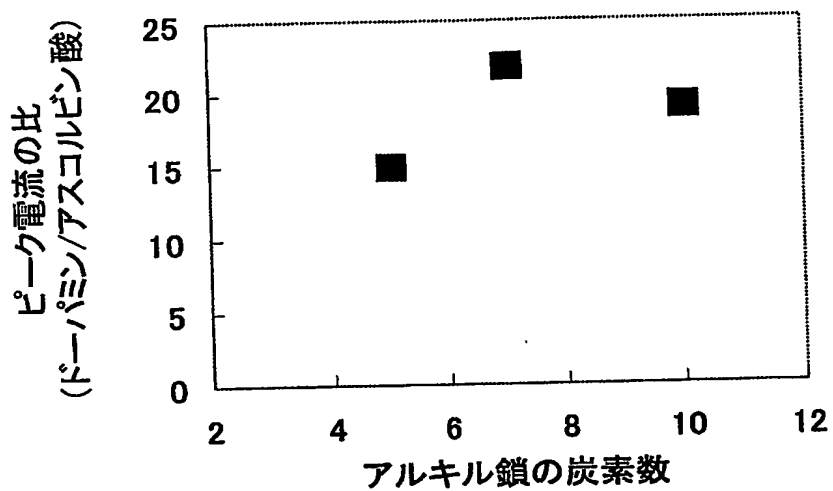
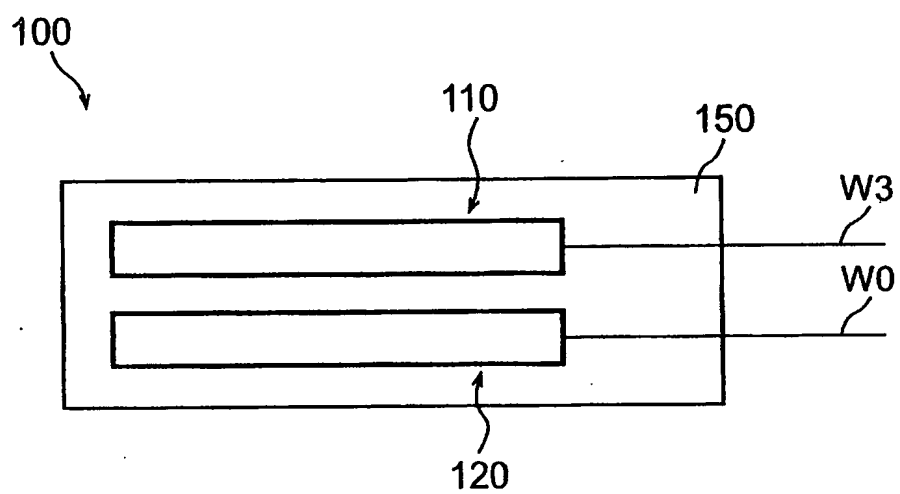


FIG. 13



## 符号の説明

- 3…容器
- 5…試料溶液
- 7…ポテンシヨ・ガルバノスタット装置
- 9…コンピュータ
- 10…センサー
- 11…対向電極
- 12, 120…修飾電極
- 13…参照電極
- 15, 150…基板
- 16…金電極
- 18…自己組織化単分子膜
- 100…センサーモジュール
- 110…白金電極
- W0～W4…電線

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/003467

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
Int.Cl<sup>7</sup> G01N27/327

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
Int.Cl<sup>7</sup> G01N27/327Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched  
Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2004  
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2004 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2004Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
JICST (JOIS)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Hai-qian ZHANG et al., Selective Redox Reaction of a Hydrophobic Mediator on a Self-assembled Monolayer Electrode and Its Application to a High Performance Enzyme Sensor, Electrochemistry, Vol.67, No.12, 05 December, 1999 (05.12.99), pages 1206 to 1207	1-8
X	Hiroaki SHINOHARA, "Denkyoku Kaimen Bunshi Shuseki Maku no Sekkei ni yoru Seitai Juyo Busshitsu no Kosentaku Sensing", Ministry of Education Kagaku Kenkyuho Hojokin Tokutei Ryoiki Kenkyu (A) Kozo Kisei Kino Kaimen no Kochiku to Denkyoku Han'no Heisei 10 Nendo Seika Hokokusho, 17 November, 1999 (17.11.99), pages 145 to 146	1-8

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

## \* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
20 April, 2004 (20.04.04)Date of mailing of the international search report  
11 May, 2004 (11.05.04)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/003467

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Hiroaki SHINOHARA, "Denkyoku Kaimen Bunshi Shuseki Maku no Sekkei ni yoru Seitai Juyo Busshitsu no Kosentaku Sensing", Ministry of Education Kagaku Kenkyuhi Hojokin Juten Ryoiki Kenkyu Kozo Kisei Kino Kaimen no Kochiku to Denkyoku Han'no Heisei 9 Nendo Seika Hokokusho, 1988., pages 139 to 140	1-8
A	JP 2001-264284 A (Matsushita Kotobuki Denshi Kabushiki Kaisha), 26 September, 2001 (26.09.01), Full text; all drawings (Family: none)	1-8
A	Shinya WATANABE et al., Fructose Biosensor on D-fructose Dehydrogenase and Phenanthroline Cobalt Complex as a Mediator, Electrochemistry, Vol.70, No.4, 05 April, 2002 (05.04.02), pages 258 to 263	1-8

<b>A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))</b> Int. Cl <sup>7</sup> G 01 N 27 / 3 2 7			
<b>B. 調査を行った分野</b> 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl <sup>7</sup> G 01 N 27 / 3 2 7			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報      1922-1996年 日本国公開実用新案公報      1971-2004年 日本国登録実用新案公報      1994-2004年 日本国実用新案登録公報      1996-2004年			
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) J I C S T (J O I S)			
<b>C. 関連すると認められる文献</b>			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号	
X	Hai-qian ZHANG et al, Selective Redox Reaction of a Hydrophobic Mediator on a Self-assembled Monolayer Electrode and Its Application to a High Performance Enzyme Sensor, 電気化学および工業物理化学, Vol. 67, No. 12, 1999. 12. 05, p. 1206-1207	1-8	
X	篠原寛明, 電極界面分子集積膜の設計による生体重要物質の高選択センシング, 文部省科学研究費補助金 特定領域研究 (A) 構造規制機能界面の構築と電極反応 平成10年度成果報告書, 1999. 11. 17, p. 145-146	1-8	
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		の日の後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献	
国際調査を完了した日      20. 04. 2004.		国際調査報告の発送日      11. 5. 2004	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 竹中 靖典 電話番号 03-3581-1101    内線 3251	

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	篠原寛明, 電極界面分子集積膜の設計による生体重要物質の高選択センシング, 文部省科学研究費補助金 重点領域研究 構造規制機能界面の構築と電極反応 平成9年度成果報告書, 1998. . . , p. 139-140	1-8
A	J P 2001-264284 A (松下寿電子株式会社), 2001. 09. 26, 全文全図 (ファミリーなし)	1-8
A	Shinya WATANABE et al, Fructose Biosensor on D-fructose Dehydrogenase and Phenanthroline Cobalt Complex as a Mediator, 電気化学および工業物理化学, Vol. 70, No. 4, 2002. 04. 05, p. 258-263	1-8